

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problems Mailbox.**

(54) REAGENT FOR MEASURING COMPLEMENT VALUE

(11) 62-299764 (A) (43) 26.12.1987 (19) JP
 (21) Appl. No. 61-142705 (22) 20.6.1986
 (71) TOSHIBA CORP (72) MASAKO HADO(3)
 (51) Int. Cl. G01N33/544

PURPOSE: To improve measurement sensitivity over a wide range by constituting the titled reagent of at least either of phospholipid or glycolipid or pyridyl-contg. chemical material and sealing a hydrophilic labeling material into liposome.

CONSTITUTION: The liposome used for the reagent for measuring complement value is constituted of at least either of the phospholipid or glycolipid or the pyridyl group-contg. chemical material such as nicotinic acid. The constituting ratio range of said materials is preferably 80~120:1~0.1mol% phospholipid or glycolipid:pyridyl group-contg. chemical material and further, cholesterol is incorporated at about 80~120mol% thereon per 80~120mol% phospholipid or glycolipid. The labeling material to be sealed into the liposome is preferably a material which is hydrophilic and can be quantitatively determined when eluted to the outside of the liposome, for example, fluorescent material such as calcein. The complement value of a sample can be determined by measuring the outflow rate of the labeling material.

(54) MONOCLONAL ANTIBODY AND METHOD FOR MEASURING PSEUDOLYSINE ϕ USING SAID ANTIBODY

(11) 62-299765 (A) (43) 26.12.1987 (19) JP
 (21) Appl. No. 61-143484 (22) 19.6.1986
 (71) SENDAI BISEIBUTSU KENKYUSHO (72) KUNIHICO ITO(3)
 (51) Int. Cl. G01N33/574, G01N33/577// C07K15/04, C12N5/00, C12N15/00, C12P21/00(C12P21/00, C12R1:91)

PURPOSE: To easily and quickly discriminate the presence or absence of a progressive cancer or not by adding a monoclonal antibody to pseudolysine ϕ to a specimen and measuring the generated composite pseudolysine ϕ -monoclonal antibody material.

CONSTITUTION: An animal is immunized by using the pseudolysine ϕ and the spleen cells of the animal are sampled. The pseudolysine ϕ is conjugated to a carrier protein of bovine serum albumin, etc., and is then used as an immune source. The resultant spleen cells are made confluent with the myeloma cells to obtain a hybridoma. The pseudolysine ϕ is measured by using the monoclonal antibody produced from the resultant hybridoma, by which the presence or absence of the progressive cancer is easily and quickly discriminated.

(54) MONOCLONAL ANTIBODY AND METHOD FOR MEASURING 1-METHYL ADENOSINE USING SAID ANTIBODY

(11) 62-299766 (A) (43) 26.12.1987 (19) JP
 (21) Appl. No. 61-143483 (22) 19.6.1986
 (71) SENDAI BISEIBUTSU KENKYUSHO (72) KUNIHICO ITO(3)
 (51) Int. Cl. G01N33/577

PURPOSE: To make the easy and quick discrimination of the presence or absence of a progressive cancer by adding a monoclonal antibody to 1-methyl adenosine to a specimen and measuring the generated 1-methyl adenosine-monoclonal antibody complex.

CONSTITUTION: An animal is immunized by using the 1-methyl adenosine and the spleen cells of the animal are sampled. The 1-methyl adenosine alone cannot be an immune source in this stage; therefore, a carrier protein such as bovine serum albumin is conjugated thereto and the conjugate is used as the immune body. The spleen cells of the resulted immune animal are fused with the myeloma cells to obtain a hybridoma. The 1-methyl adenosine is measured by using the monoclonal antibody produced from the resulted hybridoma, by which the presence or absence of the progressive cancer is easily and quickly discriminated.

⑬ 日本国特許庁(JP)

⑭ 特許出願公開

⑯ 公開特許公報(A)

昭62-299765

⑮ Int. Cl.⁴
G 01 N 33/574
33/577
// C 07 K 15/04
C 12 N 5/00
15/00
C 12 P 21/00
(C 12 P 21/00
C 12 R 1:91)

識別記号

庁内整理番号

⑰ 公開 昭和62年(1987)12月26日

Z-7906-2G
7906-2G
8318-4H
7115-4B
7115-4B
6712-4B

審査請求 未請求 発明の数 2 (全6頁)

⑱ 発明の名称 単クローン性抗体及びこれを用いるシュードウリジンφの測定法

⑲ 特 願 昭61-143484

⑳ 出 願 昭61(1986)6月19日

㉑ 発 明 者 伊 藤 邦 彦 仙台市郡山字源兵衛西13-4
㉒ 発 明 者 馬 島 敏 郎 仙台市八幡1-6-22 佐重ハイツ402号
㉓ 発 明 者 石 田 名 香 雄 仙台市角五郎1-5-40
㉔ 発 明 者 水 柿 道 直 仙台市国見1-7-33
㉕ 出 願 人 財団法人 仙台微生物 仙台市葉山町5番12号
研究所
㉖ 代 理 人 弁理士 有賀 三幸 外2名

明 細 書

1. 発明の名称

単クローン性抗体及びこれを用いるシュードウリジンφの測定法

2. 特許請求の範囲

1. シュードウリジンφに対する単クローン性抗体。

2. 次の性質、

(1) 抗体のクラス：IgG、

(2) 抗体価：8～16倍

(3) 交差反応性：

(i) ウリジン 95～99%

(ii) ウラシル 30～40%

を有する特許請求の範囲第1項記載の単クローン性抗体。

3. 被検体にシュードウリジンφに対する単クローン性抗体を加え、生じたシュードウリジンφ-単クローン性抗体複合物量を測定することを特徴とするシュードウリジンφの測定法。

3. 発明の詳細な説明

(産業上の利用分野)

本発明は単クローン性抗体に関し、更に詳細には進行癌のマーカーであるシュードウリジンφ(pseudouridine φ)に対する単クローン性抗体に関する。

(従来の技術及びその問題点)

近年癌関連抗原に対する単クローン性抗体を用いた臨床検査診断が盛んに実施されている。また、癌になると増加することが知

られている物質である癌胎児性抗原 (CEA)、 α -フェトプロテインなどに対する抗体を用いて同様なことが行われている。

ところで、癌になると増加する物質、すなわち腫瘍マーカーと呼ばれている物質の中で、進行癌患者尿中に増加するものとしてシュードクリジン ϕ が知られている。この物質はトランスファ-リボヌクレイックアシド

(t-RNA)の構成成分の1つであり、その増加の原因は、癌組織におけるt-RNAのブレークダウン (breakdown) が正常組織に比較し、亢進しているためであるといわれているが、その増加のメカニズムの詳細については未解明である。

現在、このシュードクリジン ϕ (以下

「 ϕ 」と略称することがある)の量を測定し、これから進行癌の存在を判定する試みがなされているが、 ϕ の定量は高速液体クロマトグラフィー (HPLC) でおこなわれるため、サンプルの前処理等が煩雑であり、多検体を測定するには非常に長時間を要するという欠点があった。

(問題点を解決するための手段)

本発明者らは、簡便な ϕ の測定法を開発すべく、種々検討をおこなった結果、 ϕ に対する単クローン性抗体を新たに作成し、これを用いることにより、尿サンプルの前処理操作を行うことなくELISA法を応用した多検体同時測定方法を実施することができ、測定の迅速化、簡素化がはかれることを見出した。

したがって、本発明は、進行癌のマーカーである ϕ に対する単クローン性抗体及びこれを用いる ϕ の測定方法を提供するものである。

本発明の ϕ に対する単クローン性抗体は、例えば次の如くして調製される。

すなわち、まず、 ϕ を用いて動物を免疫し、その動物の脾細胞を採取する。この工程において、 ϕ はそれ単独では免疫原となり得ないので、適当なキャリア・プロテイン (Carrier Protein) と結合させたのち、免疫原として用いる。 ϕ としては、例えば進行癌患者の尿中から公知の方法、例えばシグマ (Sigma) 社から販売されている標品を用いることができ、キャリア・プロテインとしては、ハプテン部分を免疫担当細胞が認識することを可能

にする目的で用いられるプロテイン、例えばキーホール・リンベット・ヘモシアニン、牛血清アルブミン等を用いることができる。また、この ϕ とキャリア・プロテインを結合する方法としては、例えば、核酸塩基の糖部分を過ヨウ素酸で酸化したのちにキャリア・プロテインと結合させる等の方法が挙げられる。更に、免疫動物としては、マウス、ラット等が挙げられる。

次に得られた免疫動物の脾細胞を骨髓腫細胞と融合し、ハイブリドーマを得る。細胞融合においては、公知のポリエチレングリコールを用いる方法及びウイルスを用いる方法のいずれを用いても良いが、ハイブリドーマのスクリーニングに当つては、キャリア・プロ

テインに対する抗体産生ハイブリドーマを除去するための留意が必要である。このためには、免疫に用いたキャリア・プロテインと異なつた理由来のプロテインとφを結合させたものを抗原としてスクリーニングする等の方法を用いることが望ましい。

斯くして得られるハイブリドーマから産生される、本発明の単クローン性抗体は、次に示す如き性質を有する。

- (1) 抗体のクラス：IgG₁
- (2) 抗体価：8～16倍
- (3) 交差反応性：
 - (i) ウリジン 95～99%
 - (ii) ラシニル 30～40%

叙上の如くして得られた単クローン性抗体

の1000倍希釈液を各ウエルに100μLずつ添加する。室温で30分間反応させたのちに、PBSでよく洗い、水分を切つたのちに基質溶液（パラニトロフェニルフォスファート1mg/mL、pH 9.8ジエタノールアミンバッファ）を100μLずつ加え、37℃で30分間反応させる。各ウエルの405nmにおける吸光度をEIAリーダーで測定することにより試料中に存在するφ量の定量を行なう。

〔本発明の効果〕

以上のように本発明の単クローン性抗体を用いれば、試料の前処理をおこなうことなくφの測定をおこなうことができ、しかもHPLCの如き大がかりな装置も必要としないので、

を用いてφを測定する場合の例を挙げれば次の通りである。

すなわち、96ウエルプレートに、φと牛血清アルブミン（BSA）の結合物を2μL/穴で添加したのち、4℃で、12～24hr放置する。次に各ウエルに1% BSAを含むリン酸緩衝生理食塩水（PBS）を100μLずつ添加することにより、抗体その他のタンパクの非特異的吸着を防止する。次に試料（尿など）を各ウエルに50μL添加し、さらに、本発明の単クローン性抗体（20倍希釈液）を各ウエルに50μL添加する。よくかくはんしたのちに、4℃で1時間放置する。反応混合物をPBSでよく洗浄したのちに、アルカリホスファターゼ標識ヤギ抗マウスIgG抗体

簡便かつ迅速に進行癌の有無を判定することができる。

〔実施例〕

次に実施例を挙げ、本発明を説明する。

実施例1

(1) 免疫原の調製：

癌患者の尿中から常法により分離したφと、キャリアプロテインであるキーホール・リンペット・ヘモシアニン（Keyhole limpet hemocyanine；KLH）をエルランガー（Erlanger）とビーザー（Bioser）の方法（過ヨウ素酸化法）により結合した。すなわちφを過ヨウ素酸で酸化し、過剰の過ヨウ素酸をエチレングリコールで分解したのち、アルカリ性（pH 9～9.5）条件下でKLHと

結合させ、シッフ塩基を形成させる。ついで NaBH_4 で還元し、安定化合物を生成させる。この反応混合物を緩衝液(リン酸緩衝生理食塩水、 pH 7.4)中で一晩透析し、未反応の ϕ を除き、このあと凍結乾燥に付し -20°C の冷蔵庫中に保存した。

(2) 単クローン性抗体の作成:

(i) (1)で得た ϕ と KLH 結合物を、フロイントの完全アジュバント(Freund's Complete Adjuvant)と等量混合し、エマルジョンとしたのち、BALB/cマウスの腹腔内に一匹当たり $50\mu\text{l}$ 投与した。2回目以降は不完全アジュバント(incomplete adjuvant)を用いたエマルジョンを、10日間隔で2回腹腔内に投与した。最終免疫は ϕ -KLH $100\mu\text{l}$

/ml 溶液を 0.2 ml 静脈内投与した。

(ii) 最終免疫の3日後に、過免疫マウスから摘出した脾細胞と BALB/c マウス由来ミエローマ細胞株 $\text{sp}2/0-\text{Ag}14$ をポリエチレングリコール(PEG)4000を用いて融合した。細胞は96穴プレートに $100\mu\text{l}$ /穴ずつ加え、24時間後に培地の半量をハット(HAT)培地に交換し2日おきに培地交換した。7~10日後にHAT耐性のハイブリドーマの成長がみられてくる。この時期に培地をHTに変え、約10日間培養したのちにハイブリドーマ生育培地に変えた。

(iii) 抗体産生細胞のスクリーニングは ϕ と牛血清アルブミン(BSA)を結合させたものを抗原として用い2抗体エライザ(ELISA)法

により行つた。この方法により最も要慮されるキャリアプロテインに対する抗体を産生するハイブリドーマの除外に成功した。次に ϕ による阻害がかかるか否かを検討することにより ϕ と特異的に反応する単クローン性抗体を産生するハイブリドーマを選択した。ここで選択された細胞株に限界希釈法によりクローン化し単クローン性抗体産生ハイブリドーマクローンを樹立した。

(3) 単クローン性抗体の性質:

ϕ に対する単クローン性抗体は2種得られ抗体のクラスはいずれも IgG₁ であつた。抗体価は $8 \sim 16$ 倍(培養上清を2段階希釈し、それぞれと ϕ -BSA を反応させる ELISA を行つた時、最も高い吸光度の持続する希釈

倍率を抗体価とした)であつた。

また、種々のプリン、ピリミジン修飾、非修飾ヌクレオチドおよび塩基類との交差反応性を検討したところウリジンに $95 \sim 99\%$ 、ウラシルに $30 \sim 40\%$ の交差反応性を示したが、他の化合物とは交差反応は示さなかつた。その結果から、この抗体の認識するエピトープは ϕ の塩基部分であると判断された。

実施例2

ϕ の 10 、 5 、 2.5 、 1.25 、 $0.63\mu\text{l}$ /ml 溶液を、あらかじめ ϕ -BSA $0.2\mu\text{l}$ /穴でコートされた96穴プレートへ $50\mu\text{l}$ ずつ加え、実施例1で得られた単クローン性抗体の20倍希釈液を $50\mu\text{l}$ ずつ加え、競合阻害試験を行つた。この結果、第1図に示

すように遊離のφの用量に依存して抗体とφ-BSAの結合が阻害されることが明らかとなった。

実施例3

実施例2のφ溶液に代えて試料として正常人及び癌患者の尿を用い、同様に競合阻害試験をおこなった。実施例2の結果から得た検量線を用い、試料中のφ量を測定した。この結果を下表に示す。

試料番号*	シュードクリンφ量 (nmol / μmol creatinine)	
1	742±00	(1.00)**
2	1037.2±55.4	(1.40)
3	1854.4±218.6	(2.50)
4	922.8±54.6	(1.24)
5	1242.0±14.1	(1.67)
6	1421.7±51.4	(1.92)
7	1147.4±38.3	(1.55)
8	600.8±12.1	(0.81)
9	749.5±163.9	(1.01)

* 各試料は次の通りである。

- 1 正常人尿
- 2 癌患者尿 (肝臓癌、肺転移)
- 3 " (原発性肝癌)
- 4 " (胆管細胞癌)
- 5 " (胃癌)

- 6 " (原発性肝癌)
- 7 " (急性骨髄性白血病)
- 8 } 正常人尿
- 9 }

** カッコ内は、正常人尿中のφ量に対する各試料のφ量の比を示すものである。

4. 図面の簡単な説明

第1図は、φの用量と405nmの吸光度の関係を示す図面である。

以 上

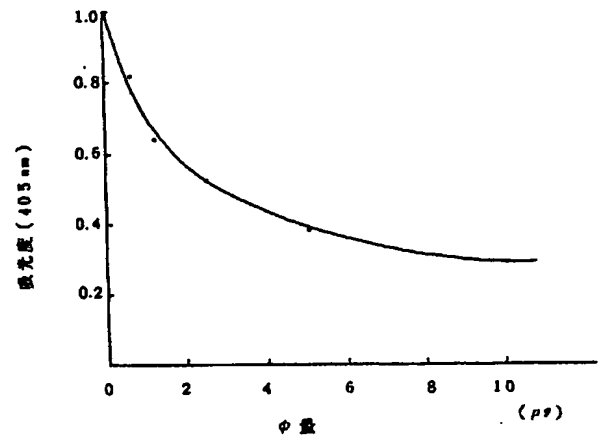
出 願 人 財団法人 仙台微生物研究所

代理人 弁理士 有 賀 三 幸

弁理士 高 野 登志雄

弁理士 小 野 信 夫

第1図



手続補正書(自発)

昭和61年7月3日

特許庁長官 宇賀辺 郎 殿

1. 事件の表示 61-143484
昭和61年6月19日提出の特許願(2)
2. 発明の名称
単クローン性抗体及びこれを用いるシュードクリシンφの測定法
3. 補正をする者
事件との関係 出願人
名称 財団法人 仙台微生物研究所
4. 代理人
住所 東京都中央区日本橋人形町1丁目3番6号(T103)
共同ビル 電話(669)090400
氏名 (6870) 弁護士 有賀 三幸
住所 同上
氏名 (7756) 弁護士 高野 登志雄
住所 同上
氏名 (8632) 弁護士 小野 信夫

5. 補正命令の日付

自 発

6. 補正の対象

明細書の「発明の詳細な説明」の欄

7. 補正の内容

(1) 明細書中、第8頁、第4行をいし第5行

「2 μφ / 穴」とあるを

「0.2 μφ / 穴」と訂正する。

(2) 同第13頁、第7行

「細胞株に」とあるを

「細胞株を」と訂正する。